

- Iwakura Y, Kubo M, Ng Lg, Hashimoto T, Fuentes J, Guttman-Yassky E, Miyachi Y, Kabashima K. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1064-9.
- 5) Piao Z, Akeda Y, Takeuchi D, Ishii KJ, Ubukata K, Briles DE, Tomono K, Oishi K. Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice. *Vaccine*. 2014 Sep 29;32(43):5607-13.
- 6) Uraki R, Das SC, Hatta M, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Ozawa M, Coban C, Ishii KJ, Kawaoka Y. Hemozoin as a novel adjuvant for inactivated whole virion influenza vaccine. *Vaccine*. 2014 Sep 15;32(41):5295-300.
- 7) Mizukami T, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Araki K, Furuhashi K, Ishii KJ, Hamaguchi I, Yamaguchi K. System vaccinology for the evaluation of influenza vaccine safety by multiplex gene detection of novel biomarkers in a preclinical study and batch release test. *PLoS One*. 2014 Jul 10;9(7):e101835.
- 8) Hemmi M, Tachibana M, Tsuzuki S, Shoji M, Sakurai F, Kawabata K, Kobiyama K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. The early activation of CD8⁺ T cells is dependent on type I IFN signaling following intramuscular vaccination of adenovirus vector. *Biomed Res Int*. 2014;2014:158128.
- 9) Yagi M, Bang G, Tougan T, Palacpac NM, Arisue N, Aoshi T, Matsumoto Y, Ishii KJ, Egwang TG, Druilhe P, Horii T. Protective epitopes of the *Plasmodium falciparum* SERA5 malaria vaccine reside in intrinsically unstructured N-terminal repetitive sequences. *LoS One*. 2014 Jun 2;9(6):e98460.
- 10) Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, Haseda Y, Shimizu M, Kohyama M, Kobiyama K, Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshioka Y, Ishii KJ, Coban C. Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe*. 2014 May 14;15(5):551-63.
- 11) Onishi M, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Coban C, Ishii KJ. Hemozoin is a potent adjuvant for hemagglutinin split vaccine without pyrogenicity in ferrets. *Vaccine*. 2014 May 23;32(25):3004-9.
- 12) Imanishi T, Ishihara C, Badr Mel S, Hashimoto-Tane A, Kimura Y, Kawai T, Takeuchi O, Ishii KJ, Taniguchi S, Noda T, Hirano H, Brombacher F, Barber GN, Akira S, Saito T. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. *Nat Commun*. 2014 Apr 10;5:3566.
- 13) Lam AR, Le Bert N, Ho SS, Shen YJ, Tang ML, Xiong GM, Croxford JL, Koo CX, Ishii KJ, Akira S, Raulet DH, Gasser S. RAE1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by STING-dependent DNA sensor

pathways in lymphoma. *Cancer Res.* 2014
Apr 15;74(8):2193-203.

2. 学会発表

- 1) Kuroda E, Ishii KJ. Particulate-induced systemic IgE production is mediated by DAMPs released from alveolar macrophages. 22nd International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe. June 2-3, 2014.
- 2) Kobiyama K, Ishii KJ. K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonist targets macrophages and dendritic cells in the draining lymph node to exert its adjuvanticity. 22nd International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe. June 2-3, 2014.
- 3) Kobiyama K, Ishii KJ. Differential roles of antigen presentation and DNA adjuvanticity in immunogenicity of DNA vaccine. 2014 DNA Vaccine Conference. San Diego, California, USA. Jul 21-23, 2014.
- 4) Aoshi T, Nakatsu N, Igarashi Y, Ito J, Kishishita N, Yamada H, Mizuguchi K, Ishii KJ. Adjuvant Database Project: comprehensive transcriptome analysis in animal models. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 5) Coban C, Onishi M, Ozkan M, Ishii KJ. Potential and mechanism of Hemozoin as vaccine adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 6) Hayashi M, Aoshi T, Petrovsky N, Ishii KJ. AdvaxTM, a formulation of delta inulin microparticles, is a non-canonical adjuvant that induces distinct immune response depending on the property of vaccine antigen. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 7) Kobiyama K, Kitahata Y, Ishii KJ. K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonistic ligand works as a potent IFN inducer and CTL adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 8) Kobiyama K, Kitahata Y, Ishii KJ. Antigen free systemic monotherapy by nano-particulate TLR9 agonist induces CTL responses for the tumor regression. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 9) Kuroda E, Ozasa K, Kobiyama K, Ishii KJ. Particulate-induced systemic IgE production is mediated by DAMPs released from alveolar macrophages. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 10) Ozkan M, Onishi M, Ishii KJ, Coban C. Investigation of Potential and Mechanism of Hemozoin as Vaccine adjuvant. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.

11) Temizoz B, Kuroda E, Kobiyama K, Ishii KJ. Synergistic activity of TLR9- and STING-agonists in innate and adaptive Type-II IFN production. 第43回 日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.

招待講演

- 1) 2014年4月27~30日 23th.National Congress of Immunology 「Good and Bad Inflammation During Vaccination」
- 2) 2014年5月14日 熊本大学 最先端研究セミナー (リエゾンラボ研究会) 「Adjuvant Innovation for influenza and cancer vaccination」
- 3) 2014年6月1日 第40回神戸薬科大学卒業研修講座「ワクチン開発研究の最前線 安全安心なワクチンを目指して」
- 4) 2014年7月2日~4日 第41回日本毒性学会学術年会 教育講座 座長「がんワクチン開発の現状と課題」シンポジウム 座長「ワクチンの安全性評価」
- 5) 2014年7月11日 京都府立医科大学 特別講義「ワクチン、アジュバントの基礎と臨床：細胞死とマクロファージの役割」
- 6) 2014年8月25日~26日 第2回免疫記憶ーワクチン国際研究会シンポジウム 「Innovation and renovation of vaccine adjuvant」
- 7) 2014年9月11日~12日 第21回日本免疫学会学術年会 「ワクチンの副作用は予測できるか？安全なアジュバントとバイオマーカー開発の新展開」
- 8) 2014年9月18日 日本生物科学研究所

第二研究会「アジュバント開発研究の最前線“免疫の種差と動物ワクチン”」

- 9) 2014年9月25~26日 第73回日本癌学会学術総会「次世代アジュバントの開発研究」
- 10) 2014年10月8日~13日 Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. 「Nucleic Acids as "Built-in" or "Inducible" Adjuvant during Vaccination」
- 11) 2014年10月16日 「医薬品等区分」俯瞰に関するワークショップ「次世代ワクチン<アジュバント>」
- 12) 2014年10月18日 第87回日本生化学会大会「RNA Polymerase-IIIは細胞質のRNA:DNAハイブリッドと細胞内miRNA発現を制御する」
- 13) 2014年10月18日~19日 第46回日本小児感染症学会総会・学術集会「過去の歴史から学ぶこれからのワクチン開発と戦略」
- 14) 2014年10月20日~21日 The 1st International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014 (東京大学) 「Nucleic acids as 'built-in' or 'inducible' adjuvant during vaccination」
- 15) 2014年11月6~7日 The 2014 Fall Conference of The Korean Association of Immunologists 「New mechanism of action and potential biomarkers for vaccine adjuvant」
- 16) 2014年11月10日~12日 第62回日本ウ

イルス学会学術集会シンポジウム「次世代のワクチン開発～Next generation vaccine development」 「New mechanism of action and potential biomarkers for vaccine adjuvant」

17) 2014年12月4日～5日 第12回日本糖鎖科学コンソーシアム (JCGG) シンポジウム「新規アジュバント開発に向けて」

18) 2014年12月4日～5日 第27回日本バイオセラピー学会学術集会「がん免疫療法に資する核酸医薬を基盤としたアジュバントの開発」

19) 2015年2月3日 琉球大学 講義「アジュバント開発研究の新展開：安全でよく効くワクチンを目指して」

20) 2015年3月25日～28日 日本薬学会第135年会「アジュバント開発研究の最前線：データベースを駆使した安全性、有効性のバイオマーカー」

特願 2014-235934 「異なる核酸アジュバントの組み合わせによる新規 Th1 誘導性アジュバントおよびその用途」平成 26 年 11 月 20 日、石井 健・黒田 悦史・Temizoz Burcu

PCT/JP2014/084772 「免疫賦活活性を有する核酸多糖複合体の抗腫瘍薬としての応用」平成 26 年 12 月 26 日、石井 健・青枝 大貴・小檜山 康司

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

特願 2013-196206, PCT/JP2014/074835
「免疫賦活活性を有するオリゴヌクレオチド含有複合体及びその用途」平成 26 年 9 月 19 日、石井 健・小檜山 康司・青枝 大貴・武下 文彦・粕谷 祐司・丹羽 貴子・小泉 誠

結核ワクチンにおける粘膜免疫応答の解析

研究分担者	國澤 純	（独）医薬基盤研究所	プロジェクトリーダー
研究協力者	長竹貴広	同上	研究員
	鈴木英彦	同上	プロジェクト研究員

研究要旨

本研究では、ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス（hPIV2）に結核菌抗原 Ag85B を発現させた粘膜免疫誘導型新規結核ワクチン（rhPIV2-Ag85 ワクチン）の開発に関し、粘膜免疫学的な観点から免疫誘導メカニズムの解析と安全性の評価を行う。本事業の2年目である平成26年度は上記の目標達成に向け、hPIV2 感染における免疫応答を免疫組織学的解析、フローサイトメトリー解析により検討した。その結果、hPIV2 の感染により誘導性気管支関連リンパ組織（iBALT）が発達することが見いだされた。さらに、hPIV2 感染は鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）に対して強力な胚中心反応や免疫担当細胞数の増加を誘導した。また、rhPIV2-Ag85B ワクチンの経気管的な投与は経鼻的な投与に比べて脾臓での胚中心反応の誘導に優れていた。一方、経鼻的な投与は NALT での肺中心反応の誘導により優れ、鼻粘膜、肺における T 細胞数を顕著に増加させることがわかった。

A. 研究目的

多くの病原微生物の侵入門戸となっている粘膜組織には、多種多様な免疫担当細胞から構成される粘膜免疫システムが構築されており、生体防御の中核的役割を担っている。これら粘膜免疫システムの有する生体防御機能を応用した粘膜ワクチンが実用化されるようになってきた。粘膜ワクチンは、抗原を”吸わせる、飲ませる”といった方法により接種するワクチンで、すでに日本国内においても、ロタウイルスに対する2種類のワクチンが経口ワクチンとして上市されている。全身免疫系にのみ免疫応答を誘導できる従来の注射によるワクチン接種とは異なり、粘膜ワクチンは粘膜免疫と全身系免疫の両部位に免疫応答を誘導できることから、粘膜組織を初発感染部位とする病原体に対する優れたワクチンとして絶大な効果を発揮すると期待されている。

上述のように徐々に実用化のステージに入ってきている粘膜ワクチンであるが、呼吸器疾患である結核においても粘膜ワクチンの開発が期待されている。結核は世界の3大感染症の一つであ

り、日本国内でも年間2万人以上の方が罹患している。すでに使用されている結核ワクチンとして BCG が存在するが、肺結核の主要な感染患者である成人に対して明確な予防効果は認められていないことから、新規ワクチン、特に肺結核を防御するための粘膜ワクチンの開発が必要急務とされている。

本事業においては、これまでに研究代表者である保富がマウスを用いた解析から経鼻結核ワクチンとしての有効性を示している結核菌抗原 Ag85B 発現ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス（hPIV2）（rhPIV2-Ag85 ワクチン）について、研究分担者の國澤がこれまでに蓄積してきた粘膜免疫に関する知的・技術基盤を用い、rhPIV2-Ag85 ワクチンの粘膜免疫誘導メカニズムの解明と安全性の評価を行う

B. 研究方法

B-1. rhPIV2-GFP感染、フローサイトメトリー解析、免疫組織学的解析

8週齢の C57BL/6J ♀マウスをイソフルランに

より麻酔し、rhPIV2-GFP を Day (D) 0, D7 の 2 回経鼻的に投与した (1×10^8 TCID50/50 μ L/mouse)。D24 にマウスを解剖し、NALT、肺、脾臓を採取しフローサイトメトリー解析 (NALT、右肺、脾臓) と免疫組織学的解析 (左肺) を行った。

フローサイトメトリー解析のための染色においては、Fc block にて非特異的結合を阻害した回収細胞を蛍光標識した各抗体と反応させた。生細胞と死細胞は Viaprobe により識別した。

免疫組織学的解析においては、左肺を採取し氷上にて冷却した PBS で洗浄後、OCT compound に包埋し液体窒素により凍結サンプルを得た。これをクリオスタットにより切片を作製し (6 μ m)、2% NCS-PBS でブロッキング後、精製一次抗体、続いて蛍光標識二次抗体と反応させた。核は DAPI により染色した。

B-2. rhPIV2-Ag85Bの経鼻投与と経気管投与

8 週齢の C57BL/6J ♀マウスをペントバルビタールにより麻酔し、rhPIV2-Ag85B を D0, D7 の 2 回経鼻的あるいは経気管的に投与した (1×10^8 TCID50/50 μ L/mouse)。D14 にマウスを解剖し、NALT、鼻粘膜、肺、脾臓を採取しフローサイトメトリー解析を行った。

(倫理面への配慮)

各処置を麻酔下で実施し、頸椎脱臼による安楽死を実施した。

C. 研究結果

C-1. hPIV2 感染による iBALT 形成と呼吸器関連粘膜リンパ組織で観察される免疫応答

rhPIV2-GFP の経鼻投与後、肺を免疫組織学的解析に供したところ、B 細胞や T 細胞、樹状細胞の集積が認められた (図 1)。免疫細胞群のこのような集積は rhPIV2-GFP を投与していないマウスの肺では認められなかった (図 1)。またフローサイトメトリー解析によって、rhPIV2-GFP を感染させたマウスの肺では胚中心反応が誘導され、T

細胞や樹状細胞の数が増加していることが示された (図 2)。これらの免疫応答は上気道での免疫誘導組織として知られる NALT においても認められた (図 2)。以上の結果は、rhPIV2-GFP の感染により iBALT の形成が誘導されること、また、NALT や iBALT が呼吸器関連免疫誘導組織として rhPIV2-Ag85B ワクチンの免疫誘導メカニズムの一端を担っている可能性を示唆していると考えられる。

C-2. rhPIV2-Ag85B ワクチンの投与経路による免疫応答の違い

rhPIV2-Ag85B ワクチンを経気管的に投与し下気道をメインに作用させた場合と経鼻的に投与し上気道と下気道の両部位に作用させた場合とを比べると、経気管的な投与が脾臓での胚中心反応の誘導に優れていることがわかった (図 3)。一方、経鼻的な投与により上気道と下気道の両部位に作用させた場合には NALT や肺での胚中心反応の誘導に優れていた (図 3)。さらに、経鼻的な投与は経気管的な投与に比べて NALT や鼻粘膜、肺での T 細胞の数をより増加させることがわかった (図 4)。

D. 考察

本研究においては、粘膜ワクチンにおいて免疫誘導の中核となる粘膜リンパ組織に焦点を当てた研究を遂行した。今回の研究結果から、上気道に発達する NALT (ヒトではワルダイエル扁桃輪を構成する咽頭扁桃に相当すると考えられている) と、感染により誘導される下気道の iBALT は rhPIV2-Ag85B ワクチンの免疫誘導メカニズムに重要な役割を担う可能性が示唆された。

iBALT はインフルエンザ感染や喘息などの慢性炎症反応に伴って形成が誘導される三次リンパ組織として知られ、下気道での免疫誘導組織として機能することが考えられている。今回、hPIV2 感染により iBALT 形成が誘導されることが示された。さらに、NALT においても胚中心反応をはじめとする免疫応答が認められたことから、これら呼

吸器関連粘膜リンパ組織が rhPIV2-Ag85B ワクチンの免疫誘導メカニズムの一端を担っている可能性が高い。今後はこれらのリンパ節を形成する分子群の同定やその機能抑制に伴う免疫応答を解析することで、rhPIV2-Ag85B ワクチンの免疫誘導メカニズムが解明されるものと期待できる。

本研究における麻酔下での経鼻的な投与プロトコールは上気道と下気道の両呼吸器粘膜に作用する系である。一方、経気管的な投与の場合には下気道が直接的な感作の場と考えられる。これら2つの投与経路の比較により、経気管的な投与は全身性の免疫応答に優れる一方、経鼻的な投与は呼吸器粘膜での応答に優れていることが示唆された。上気道と下気道ではたらく免疫システムがそれぞれユニークな機能を発揮する可能性があり、今後その詳細を明らかにすることで rhPIV2-Ag85B ワクチンの効果を最大限に発揮するための基礎的な知見が得られることが期待される。

E. 結論

hPIV2 感染により iBALT の組織形成が誘導された。rhPIV2-Ag85B ワクチンの経気管的な投与は全身性の免疫応答に、経鼻的な投与は呼吸器粘膜での免疫応答により優れていることが示唆された。

F. 健康危険情報

総括、研究報告書にまとめて記入

G. 研究発表

1. 論文発表

1 J. Kunisawa*, M. Arita, T. Hayasaka, T. Harada, R. Iwamoto, R. Nagasawa, S. Shikata, T. Nagatake, H. Suzuki, E. Hashimoto, Y. Kurashima, Y. Suzuki, H. Arai, M. Setou, and H. Kiyono, Dietary ω 3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to

17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut. *Sci Rep* (2015, in press)

2 Y. Kurashima, H. Kiyono, and J. Kunisawa*, Pathophysiological role of extracellular purinergic mediators in the control of intestinal inflammation, *Mediators of Inflammation* (2015, in press)

3 J. Kunisawa* and H. Kiyono, Vitamins mediate immunological homeostasis and diseases at the surface of the body, *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* (2015, in press)

4 Y. Goto, T. Obata, J. Kunisawa, S. Sato, I. I. Ivanov, A. Lamichhane, N. Takeyama, M. Kamioka, M. Sakamoto, T. Matsuki, H. Setoyama, A. Imaoka, S. Uematsu, S. Akira, S. E. Domino, P. Kulig, B. Becher, J. Renauld, C. Sasakawa, Y. Umesaki, Y. Benno, and H. Kiyono, Innate lymphoid cells govern intestinal epithelial fucosylation, *Science* 345(6202): 1254009, 2014

5 A. Sato, A. Suwanto, M. Okabe, S. Sato, T. Nochi, T. Imai, N. Koyanagi, J. Kunisawa, Y. Kawaguchi, and H. Kiyono, Vaginal memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for protective T cell recruitment and prevention of genital HSV-2 disease, *J Virol* 88(23):13699-13708, 2014

6 J. Kunisawa*, E. Hashimoto, A. Inoue, R. Nagasawa, Y. Suzuki, I. Ishikawa, S. Shikata, M. Arita, J. Aoki, and H. Kiyono, Regulation of intestinal IgA responses by dietary palmitic acid and its metabolism, *J Immunol* 193: 1666-1671, 2014

- 7 Y. Kurashima, T. Amiya, K. Fujisawa, N. Shibata, Y. Suzuki, Y. Kogure, E. Hashimoto, A. Otsuka, K. Kabashima, S. Sato, T. Sato, M. Kubo, S. Akira, K. Miyake, J. Kunisawa*, and H. Kiyono, The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis, *Immunity* 40:530-41, 2014
- 8 長竹貴広、國澤純 腸管組織における多元的免疫制御システムと食物アレルギー *医学のあゆみ* (印刷中)
- 9 鈴木英彦、國澤純 粘膜免疫の特異性に着目したワクチンマテリアルの開発 *感染・炎症・免疫* (印刷中)
- 10 鈴木英彦、國澤純 CD11b陽性IgA産生細胞の誘導と機能 *臨床免疫・アレルギー科* 62: 552-556, 2014
- 11 倉島洋介、佐藤健、清野宏、國澤純 DAMPsによるマスト細胞の活性化と疾患 *臨床免疫・アレルギー科* 62: 675-679, 2014
- 12 長竹貴広、國澤純 脂質を介した腸管免疫システムの制御 *医学のあゆみ* 248, 1019-1024, 2014
- 13 鈴木英彦、國澤純 粘膜免疫システムの多面的機能を応用したワクチン開発の現状と未来 *The Frontiers in Life Sciences* 「生命科学からの創薬へのイノベーション」 57-62, 2014
- 14 鈴木英彦、近藤昌夫、八木清仁、清野宏、國澤純 微生物の有する粘膜組織指向性を用いた粘膜ワクチンデリバリー開発への展望 *薬学雑誌* 134, 629-634, 2014
- 15 近藤昌夫、國澤純 上皮細胞を標的とした創薬研究の新展開 *薬学雑誌* 134, 613, 2014
- 16 高里良宏、倉島洋介、清野宏、國澤純 抑制型免疫システムを応用した次世代型アレルギーワクチンの開発 *Bioindustry* 6, 55-60, 2014
2. 学会発表
1. 國澤純、粘膜免疫のユニーク性を標的としたワクチンの開発の最前線 *日本薬学会第135年会* 神戸 (神戸学院大学) (2015年3月28日)
2. 鈴木英彦、國澤純、Claudin-4 を標的とした経鼻ワクチンの開発 *日本薬学会第135年会* 神戸 (神戸学院大学) (2015年3月27日)
3. Jun Kunisawa、Lipid-mediated immune network in the development of intestinal allergy *第88回日本薬理学会年会* 名古屋 (名古屋国際会議場) (2015年3月20日)
4. 國澤純、腸管免疫ネットワークの学術的解明と創薬・ワクチン開発への展開 *第7回鈴鹿病態薬学研究会* 三重 (鈴鹿医療科学大学) (2015年2月25日)
5. 國澤純、腸内環境因子を介した免疫制御の基礎的解明と免疫創薬への応用 *千里ライフサイエンスセミナー -アカデミア創薬の進展-* 大阪 (千里ライフサイエンスセンター) (2015年2月13日)
6. Takahiro Nagatake, Makoto Arita, Ryo Iwamoto, Takahiro Hayasaka, Takashi Harada, Tetsuya Honda, Naomi Matsumoto, Michiko Shimojou, Risa Nagasawa, Shiori Shikata, Eri Hashimoto, Yosuke Kurashima, Yuji Suzuki, Hidehiko Suzuki, Kenji Kabashima, Hiroyuki Arai, Mitsutoshi Setou, Hiroshi Kiyono, and Jun Kunisawa, Dietary ω 3 fatty acid-originated 17,18-epoxyeicostetraenoic acid prevents the development of allergic

- inflammation in the gut and skin 6th
Phospholipase A2 and Lipid Mediators,
 Tokyo, Japan (10 - 12 February, 2015)
7. 國澤純、腸内環境を介した免疫制御とワクチン開発・免疫創薬への展開 第19回 関西大学先端科学技術シンポジウム 大阪 (関西大学) (2015年1月23日)
 8. Takahiro Nagatake, Naomi Matsumoto, Michiko Shimojou, Hidehiko Suzuki, Satoshi Fukuyama, Shintaro Sato, Kentaro Ogami, Yusuke Tsujimura, Mitsuo Kawano, Tetsuya Nosaka, Hiroshi Kiyono, Yasuhiro Yasutomi, and Jun Kunisawa, Immunological and organogenesis diversity of mucosa-associated lymphoid tissues for the development of mucosal vaccine 第8回次世代アジュバント研究会、大阪 (千里ライフサイエンスセンター) (2015年1月20日)
 9. 鈴木英彦、米満美紀、長竹貴広、池上浩司、瀬藤光利、清野宏、近藤昌夫、國澤純、Claudin-4 標的型肺炎球菌ワクチンの開発と鼻腔の物理的機能の免疫誘導に与える影響の検討 第8回次世代アジュバント研究会、大阪 (千里ライフサイエンスセンター) (2015年1月20日)
 10. Sachiko Akashi-Takamura, Natsuko Yamakawa, Takuma Shibata, Yosuke Kurashima, Jun Kunisawa, Hiroshi Kiyono, Kazuhiro Suzuki, Junichi Kikuta, Masaru Ishii, and Kensuke Miyake, MD-1 influences a binding between S1P1 and BCR 第43回日本免疫学会学術集会、京都 (国立京都国際会館) (2014年12月10-12日)
 11. Aldina Suwanto, Ayuko Sato, Shintaro Sato, Tomonori Nochi, Jun Kunisawa, and Hiroshi Kiyono, Vaginal resident memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for early clearance of genital HSV-2 infection 第43回日本免疫学会学術集会、京都 (国立京都国際会館) (2014年12月10-12日)
 12. Satoshi Ueha, Fumiko Suenaga, Jun Abe, Mizuha Kosugi, Yusuke Shono, Jun Kunisawa, Shintaro Sato, Hiroshi Kiyono, and Koji Matsushima, Loss of lymph node fibroblastic reticular cells and high endothelial cells underlies humoral immunodeficiency in mouse GVHD 第43回日本免疫学会学術集会、京都 (国立京都国際会館) (2014年12月10-12日)
 13. Jun Kunisawa Functional Diversity of IgA-producing Plasma Cells for the Development of Mucosal Vaccine The 1st International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014 (University of Tokyo, Tokyo, 21 October, 2014)
 14. 國澤純、脂質-免疫ネットワークを起点にした免疫疾患の解明と創薬研究への展開 第87回日本生化学会 京都 (国立京都国際会館) (2014年10月16日)
 15. 國澤純、東洋医学を起点とした粘膜免疫制御メカニズムの解明と創薬への展開 日本生薬学会第61回年会 福岡 (福岡大学) (2014年9月13日)
 16. 國澤純、粘膜免疫のユニーク性に基づく粘膜ワクチンの開発・免疫創薬への新展開 第30回日本DDS学会 東京 (慶応義塾大学) (2014年7月31日)
 17. 國澤純、腸内環境因子を介した免疫制御の解明と創薬・ワクチン開発への展開 第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会 京都 (同志社大学寒梅館) (2014年7月15日)
 18. Yoshifumi Kotani, Jun Kunisawa, and Hiroshi Kiyono, The mechanism underlying

the IgA enhancement of Lactobacillus pentosus strain b240 in the gut immune system FOCIS 2014, Chicago, US (25 - 28 June, 2014)

19. 國澤純、東洋医学を起点とした粘膜免疫制御メカニズムの解明と創薬への展開 第65回 日本東洋医学会学術総会 東京(東京国際フォーラム) (2014年6月28日)
20. Jun Kunisawa Commensal Bacteria and Diet in the Control of Intestinal Immunosurveillance and Diseases 18th

Annual Meeting of Intestinal Microbiology (University of Tokyo, Tokyo, 12 June, 2014)

21. 國澤純、腸内環境ネットワークを介した免疫制御とヘルスサイエンス 第14回日本抗加齢医学会総会 大阪(大阪国際会議場) (2014年6月6日)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

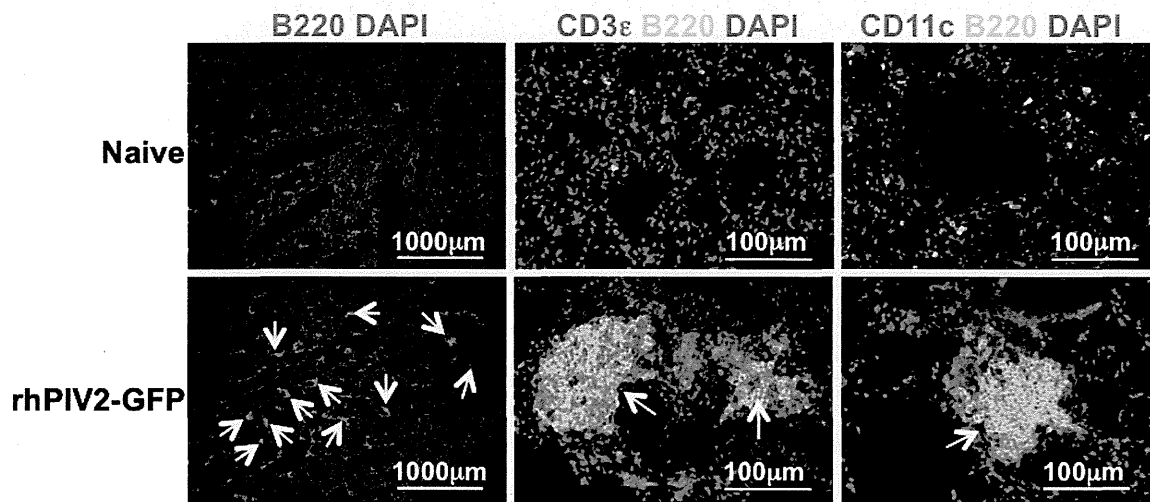


図1 rhPIV2-GFPをマウスに感染させ、肺を免疫組織学的解析に供した。rhPIV2-GFPの感染により気管支周囲または実質にB細胞、T細胞、樹状細胞の集積が認められた。矢印はB細胞の集積を指す。

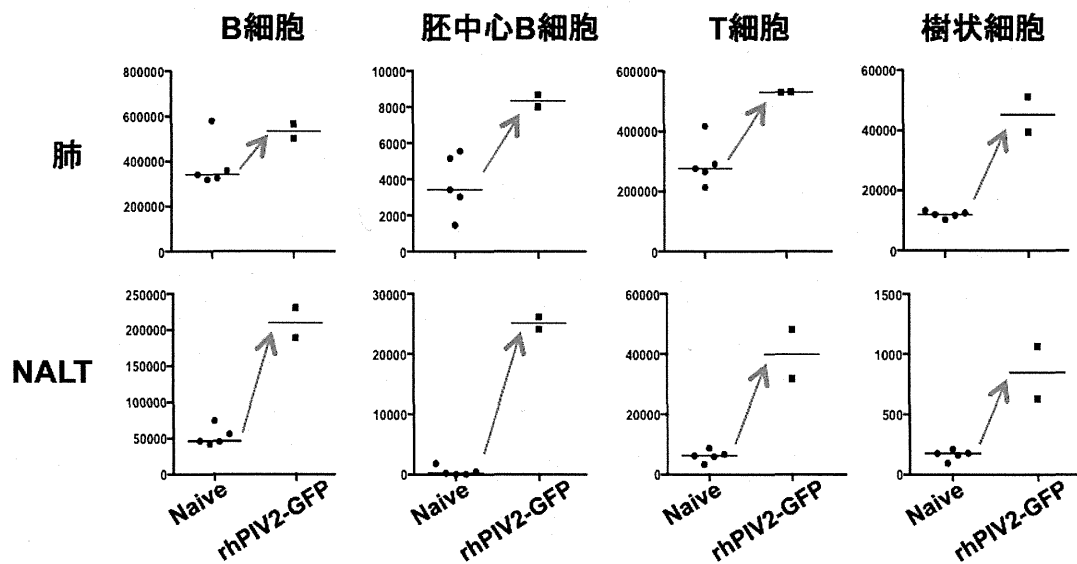


図2 rhPIV2-GFPをマウスに感染させ、肺とNALTをフローサイトメトリ解析に供し各種免疫担当細胞の数を求めた。rhPIV2-GFPの感染により肺、NALTともに各種免疫担当細胞数の増加が観察された。

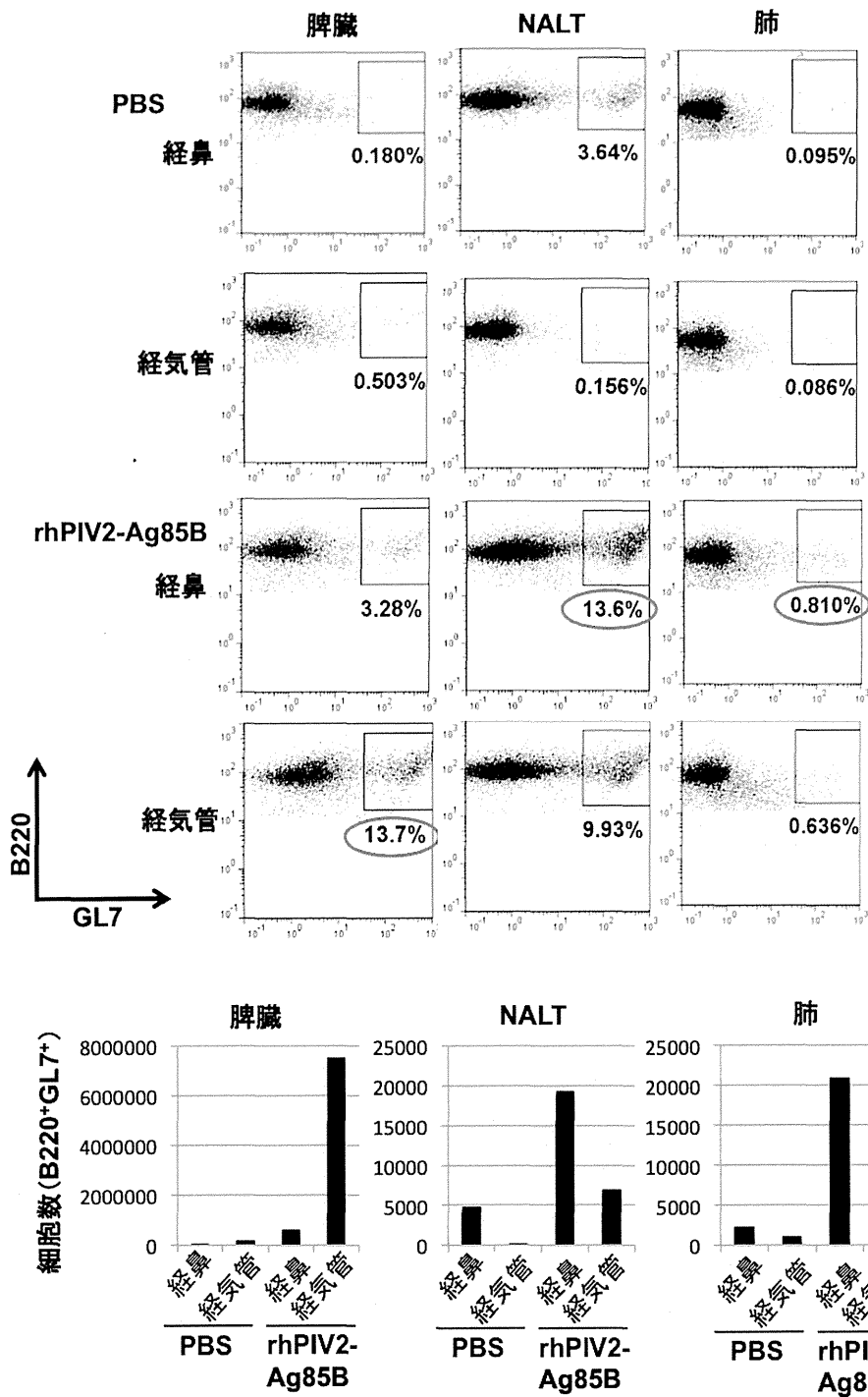


図3 rhPIV2-Ag85Bを経鼻的あるいは経気管的にマウスに感染させ、脾臓、NALT、肺をフローサイトメトリ解析に供し胚中心B細胞の数を求めた。経気管的な投与は経鼻的投与に比べて脾臓での胚中心反応の誘導に優れていた。一方、経鼻的な投与はNALTや肺での肺中心反応の誘導に効果が高かった。上段は生細胞かつB220陽性集団のフローサイトメトリ結果を、下段はB220+GL7+胚中心B細胞の数を示す。

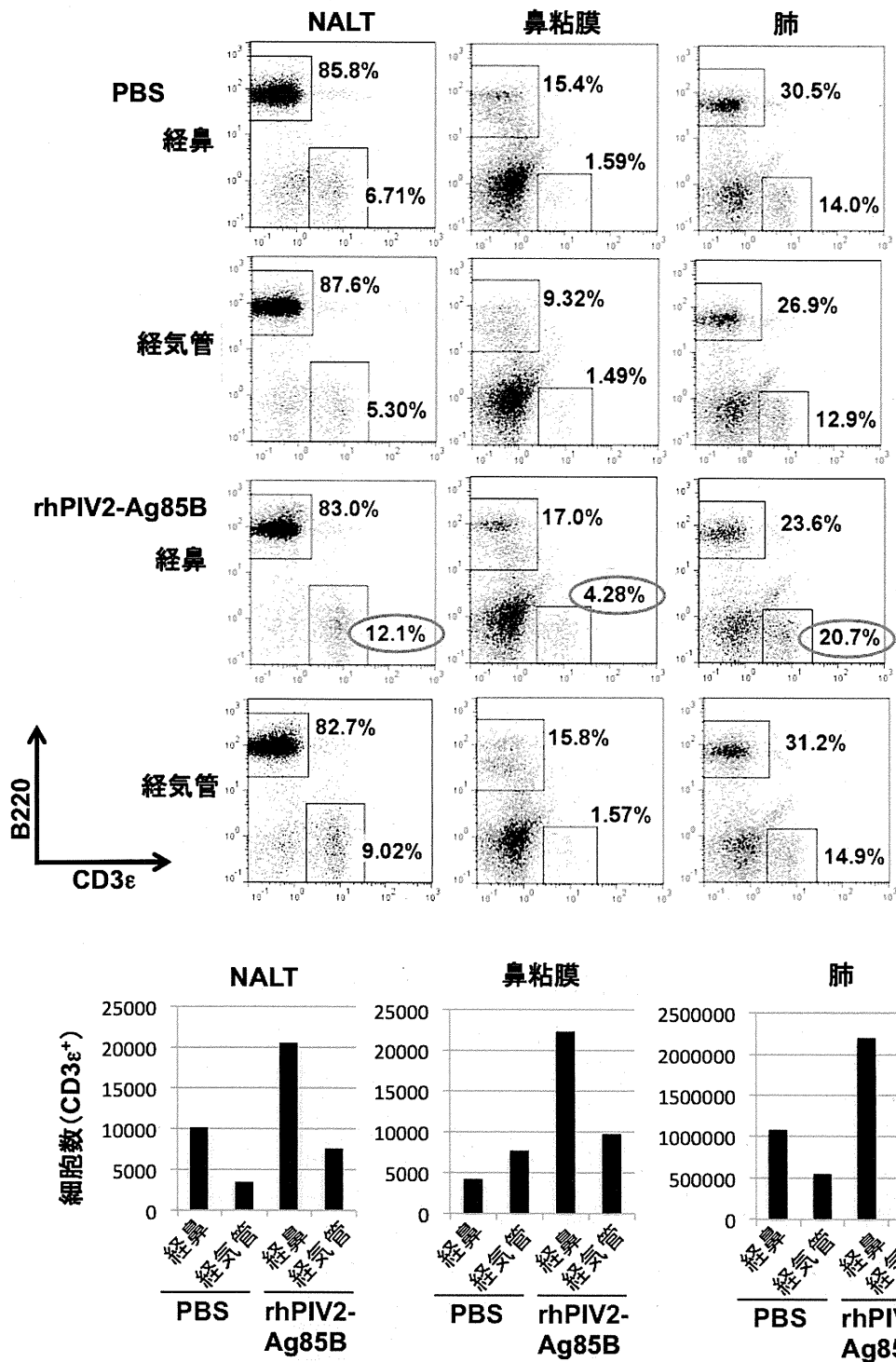


図4 rhPIV2-Ag85Bを経鼻的あるいは経気管的にマウスに感染させ、NALT、鼻粘膜、肺をフローサイトメトリ解析に供しT細胞の数を求めた。経鼻的な投与は経気管的な投与に比べてNALTや鼻粘膜、肺でのT細胞の増加が顕著に認められた。上段は生細胞集団のフローサイトメトリ結果を、下段はCD3ε⁺T細胞の数を示す。

パラインフルエンザ2型ウイルスベクターの病理学的安全性に関する研究

研究分担者 伊奈田 宏康 鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究要旨

新規結核ワクチンでベクターとして用いられるパラインフルエンザ2型ウイルス（hPIV2）の病理学的安全性を検討するために、hPIV2投与後の鼻粘膜組織標本及び嗅球の経時的変化を病理学的・免疫組織学的に解析した。hPIV2投与後24時間では、いわゆる風邪症候群に伴う鼻炎と類似の像と考えられた。今後は、実際に準じた投与に応じて局所あるいは主な臓器のより詳細な解析を行い、hPIV2ワクチンの安全性の包括的な検討を行う。

A. 研究目的

新規結核ワクチンにおいてベクターとして用いられるパラインフルエンザ2型ウイルス（hPIV2）を経鼻投与し、ワクチンの安全性について病理組織学的に検討することが目的である。前回の報告では、病理学的検討の汎用性を高めるために、骨で囲まれている鼻粘膜を骨膜とともに周囲骨組織から丁寧に剥離し、脱灰処理を行わずにHE染色を行った。特殊染色、免疫組織学的検討により、より詳細に検討を行った。

B. 研究方法

カニクイザル（6～11歳、2.8～3.5kg）を麻酔投与下、仰臥位で固定後、鼻腔よりhPIV2（ 1×10^7 TCID₅₀）を滴下し、10分間保持した。投与後0時間（コントロール）6時間、12時間、24時間後に解剖を行い、ホルマリン固定の後、鼻粘膜を骨膜とともに周囲骨組織から丁寧に剥離し、脱灰処理を行わずにHE染色にて、鼻粘膜の病理的解析を行った。また、鼻粘膜嗅部を構成する細胞を区別するため、鼻粘膜上皮細胞の染色には抗ケラチン18抗体、嗅細胞の染色には抗Olfactory

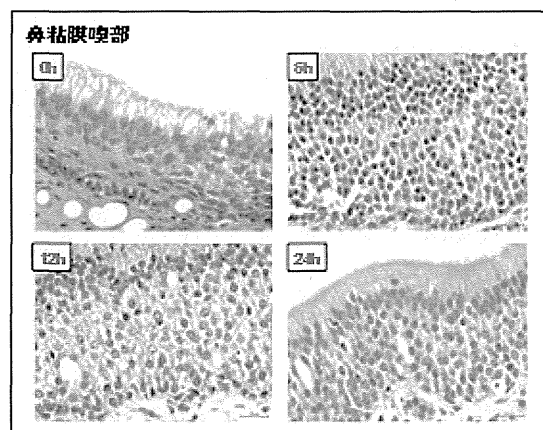
Marker Protein 抗体、支持細胞の染色には抗サイトケラチン抗体、基底細胞の染色には抗チン17抗体を用いた。また、鼻粘膜基底膜の染色をPAM染色法で行った。

（倫理面への配慮）

特に問題ない。

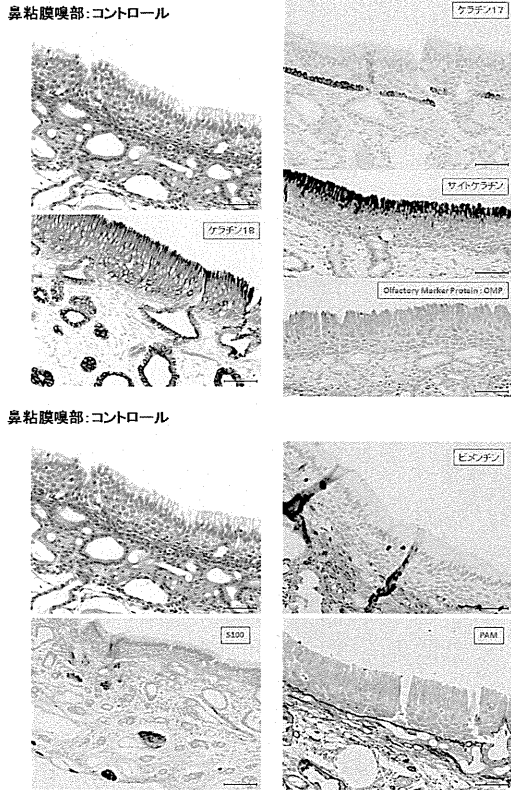
C. 研究結果

hPIV2投与6時間後では鼻粘膜嗅部の鼻粘膜上皮の肥厚、12時間後では上皮下固有層への明らかな好中球の浸潤、24時間後では好中球主体の炎症細胞浸潤の増加がみられた（図1）。



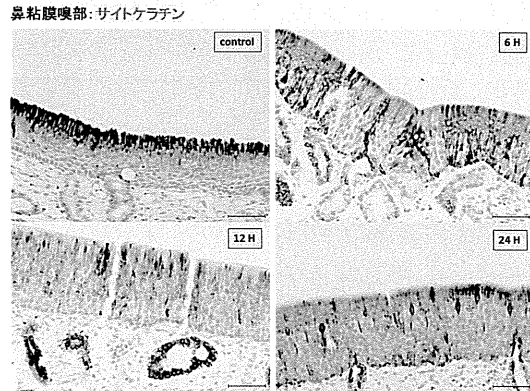
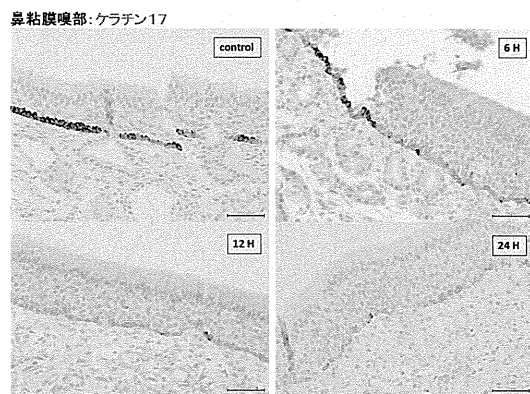
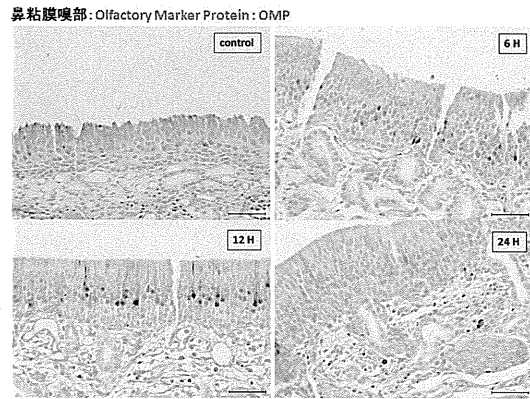
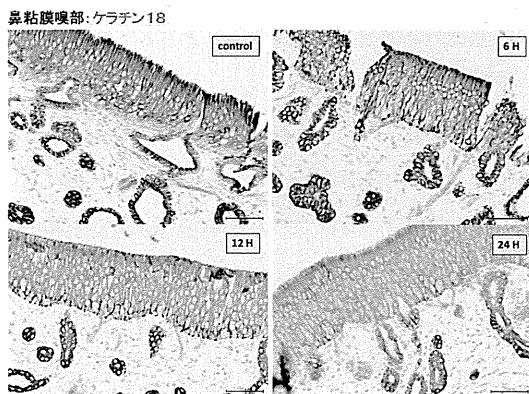
（図1：投与後の鼻粘膜嗅部のHE染色）

免疫染色により、嗅細胞、支持細胞、基底細胞からなる鼻粘膜嗅部の鼻粘膜上皮細胞を区別することを可能とし、検討を行った(図2)。



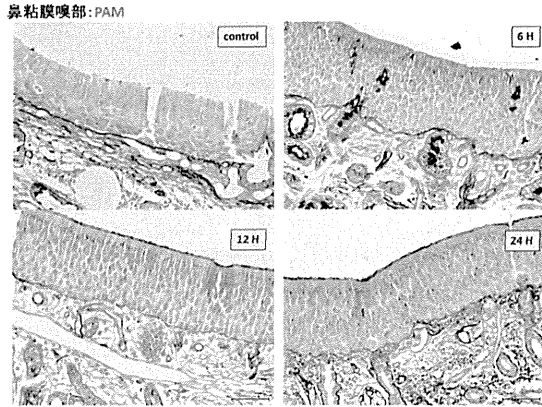
(図2: 正常鼻粘膜嗅部の免疫染色)

投与6時間後より、通常は支持細胞を染色する抗サイトケラチン抗体によって染色される領域(細胞数)が拡大し基底部まで広がった。また、嗅細胞と基底細胞の抗体染色には大きな変化は見られなかった(図3)。

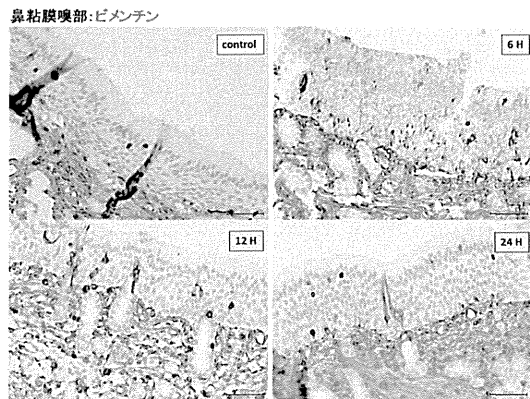


(図3: 鼻粘膜嗅部の経時的変化、各抗体による免疫染色)

また、過ヨウ素酸メセナミン銀染色(PAM染色)では、投与24時間までに明らかな基底膜障害はみられなかった(図4)。更に、上皮細胞内に炎症細胞などの数の著明な増加は見られず(図5)、hPIV2投与により嗅球には明らかな変化はみられなかった。



(図4：鼻粘膜嗅部の経時的変化、PAM染色)

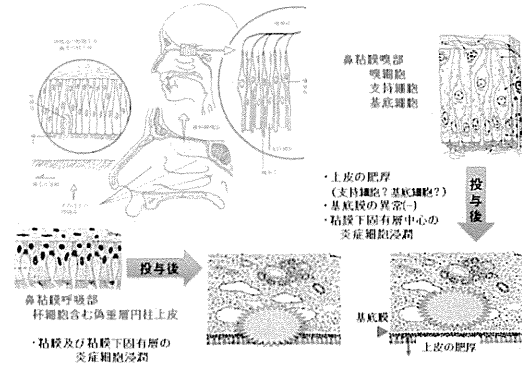


(図5：鼻粘膜嗅部の経時的変化、免疫染色)

D. 考察

hPIV2の経鼻投与による鼻粘膜の反応は、少なくとも投与後6時間で生じ、好中球を主体とする急性炎症のピークは24時間頃と考えられた。鼻粘膜呼吸部では、炎症が基底膜を越えて波及しているのに対し、鼻粘膜嗅部では、炎症細胞浸潤により粘膜基底膜の明らかな損傷や粘膜上皮細胞層への炎症細胞浸潤の明らかな増加はみられず、抗サイトケラチン抗体で染色される細胞（正常では支持細胞が染色）の染色域の拡大が認められた。また、嗅球には炎症細胞浸潤などの変化は認められなかったことから、hPIV2投与後24時間では、いわゆる風

邪症候群に伴う鼻炎（他にはアレルギー性鼻炎）と類似の像と考えられた（図6）。



(図6：まとめ)

E. 結論

hPIV2の経鼻投与による鼻粘膜の経時的な変化を、脱灰処理を行うことなく、HE染色、免疫組織や特殊染色による解析を行った。その結果、hPIV2投与後24時間の鼻粘膜局所の組織像は、いわゆる風邪症候群にともなう鼻炎に類似すると考えられた。今後は、実際にワクチンの投与スケジュールに合わせ、局所あるいは主な臓器の病理組織学的解析を行い、hPIV2ワクチンの安全性の包括的な検討を行う。また、免疫組織学的検討により、カニクイザルにおけるワクチン投与に伴う免疫動態の評価を行う予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K, Yasutomi Y.
Effects of mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung.

PLoS One. 2014 Sep 5;9(9):e106807. doi:
10.1371

2. Watanabe K, Matsubara A, Kawano
M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura
Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K, Yasu
tomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by
taking advantage of characteristics of
human parainfluenza type 2 virus vect
or showed Mycobacteria-specific immun
e responses by intranasal immunization.
Vaccine. 2014 Jan 29. pii: S0264-410X
(14)00087-5.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

遺伝子導入細胞の作製と最適なウイルス増殖法の開発

研究分担者 松尾 和浩 日本 BCG 研究所 研究第一部長

研究要旨 ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) の HN 遺伝子欠損型ウイルスベクターを効率よく産生する方法を検討した。前年度に樹立した Vero 細胞クローンに hPIV2 の HN 遺伝子発現ベクターを導入し、トランスフェクタントのクローニングを再度行った。PCR 法により全長の HN 遺伝子を保持しているクローンを選択し、95 クローン中 61 個の PCR 陽性クローンを得た。59 クローンについて、hPIV2ΔHN-EGFP ウイルスの感染・増殖を蛍光顕微鏡で観察することにより、高生産株 7 クローンを得た。これらのクローンでの HN 蛋白質発現を間接蛍光抗体法で調べたところ、HN 発現レベルとウイルス生産性に相関が認められた。この内の 5 クローンでは、hPIV2ΔHN-EGFP のタイターが 10^7 TCID₅₀ に達しており、ほぼ実用化可能なレベルと考えられる。今後、樹立した Vero/HN クローンの安定性、結核抗原遺伝子導入組換えウイルス生産量の評価、高生産法の検討を行っていく予定である。

A. 研究目的

世界で今なお結核患者は年間約 900 万人以上発生し、約 150 万人が死亡している (WHO Global tuberculosis report 2013)。本邦においても、年間 2 万人以上が新たに結核患者として登録され、2000 人以上が死亡しており (2013 年結核年報：結核予防会結核研究所)、感染症の中では最大の死亡原因となっている。現在結核菌に対する唯一のワクチンとして用いられている BCG は、小児の結核性髄膜炎や粟粒結核等には効果があるものの、成人肺結核には効果が低いと言われており、新しい結核ワクチンの開発が急務となっている。

ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) は、ヒトの呼吸器粘膜に感染性を示す病原性の低いウイルスである。我々は既に、抗酸菌由来 Ag85B 抗原遺伝子を組み込んだ hPIV2 をマウスに経鼻接種し、BCG 以上に肺での結核菌増殖を抑制することを報告した。また通常の遺伝子組換えウイルスワクチンと異なり、頻回接種によるベクターウイルスに対する反応もなく、強い免疫反応を誘導することがカニクイザルによって示されている。本研究の目的は、hPIV2 ベクター技術を応用し、結核感染をコントロールできる安全性の高い新規ワクチンを開発することにある。本分担研究は、そのためのワクチン製造法開発に関わるものである。

チンを開発することにある。本分担研究は、そのためのワクチン製造法開発に関わるものである。

昨年度より、ウイルスベクターの安全性を担保するために、遺伝子欠損型の非複製型ウイルスを生産するためのパッケージング細胞の構築を行っており、V 遺伝子発現 Vero 細胞の樹立については既に報告した。今年度は、hPIV2 の HN 遺伝子を安定に発現する Vero 細胞株を樹立し、組換えウイルスを高生産できる系の開発を目的とした。

B. 研究方法

(1) 細胞および培地

ワクチン産生用に使用する細胞は、医薬基盤研究所より分与された Vero 細胞からクローニングした細胞を用いた。培地は、無血清培地 OptiPRO SFM (Life technologies)、細胞の回収は、細胞剥離剤 TrypLE Express (Life technologies) を用いた。培養培地には抗生物質としてペニシリン・ストレプトマイシンを添加し、37°C、5%CO₂ 下で培養した。細胞凍結保存液として、セルバンカー 2 (血清不含、日本全薬工業(株)) を用いて -80°C にて凍結保存した。

(2) トランスフェクション

遺伝子導入には、前年度に構築したHN発現ベクター-pCXneoHNを用いた。6 穴プレートに $2.0-5.0 \times 10^5$ /well の濃度でVero 細胞をまき、24 時間後にプラスミドベクター $5.0 \mu\text{g}$ と Lipofectamine 2000 (Life technologies) $30 \mu\text{l}$ の割合で $500 \mu\text{l}$ の OptiPRO SFM 中で混合し、室温で 20 分間反応させた溶液を各wellに加えてトランスフェクトした。

(3) 組換えVero 細胞のクローニング

トランスフェクション24 時間後の細胞を回収し、10cm ディッシュに継代する。継代24時間後に培地を捨て、G418 (0.75 mg/ml) 含有 OptiPRO SFM に交換する。3-4日毎に培地交換を行い、2-3週間後、顕微鏡で細胞コロニーが確認できたら、他のコロニーと十分に離れたコロニーを選び、コロニーを囲むようにディッシュの底にマジックでマークする。培地を除き、PBSで洗浄した後、クローニングシリンダー及び細胞剥離剤を用いて各コロニーを回収した後、24 穴プレート、6 穴プレート及び10cm ディッシュと継代していくことで段階的にスケールアップを行い、最終的に凍結細胞ストックを作製した。

(4) Nested PCRによる導入遺伝子の検出

hPIV2のHN遺伝子をネオマイシン耐性下で導入したVero細胞由来ゲノムDNAは、細胞継代時に微量をサンプリングしてInstaGene DNA精製マトリックス (Bio-Rad社製) を用いて抽出した。これを1st PCRのDNAテンプレートとする。VまたはHN遺伝子検出に用いたPCRプライマーセットは以下の配列を持つ。

1st sense primer:

TCGGCTTCTGGCGTGTGACC

1st antisense primer:

GCCCTCCCATATGTCCTTCCGAG

Nested sense primer:

CTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTC

Nested antisense primer:

GGCAGAGGGAAAAAGATCTCAGTGGT

1st PCRは、 $94^\circ\text{C}/5\text{分}$ 、 $[94^\circ\text{C}/30\text{秒}$ 、 $68^\circ\text{C}/30\text{秒}$ 、 $72^\circ\text{C}/1\text{分}$ (V) 又は2分 (HN)] x 35サイクル、 $72^\circ\text{C}/5\text{分}$ で行った。Nested PCRは、1st PCR産物の1/50量をテンプレートにして $94^\circ\text{C}/5\text{分}$ 、 $[94^\circ\text{C}/30\text{秒}$ 、 $66^\circ\text{C}/30\text{秒}$ 、 $72^\circ\text{C}/1\text{分}$ (V) 又は2分 (HN)] x 35サイクル、 $72^\circ\text{C}/5\text{分}$ で行った。

また、ネオマイシン耐性遺伝子も同様にNested PCRにて確認を行った。プライマーセットは以下の通りである。

1st sense primer:

GTATCCGCTCATGAGACAATCG

1st antisense primer:

AAGAACTCCAGCATGAGATCCC

Nested sense primer:

CAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCG

Nested antisense primer:

ACGATTCCGAAGCCCAACCTT

1st PCRは、 $94^\circ\text{C}/5\text{分}$ 、 $[94^\circ\text{C}/30\text{秒}$ 、 $66^\circ\text{C}/30\text{秒}$ 、 $72^\circ\text{C}/1\text{分}]$ x 35サイクル、 $72^\circ\text{C}/5\text{分}$ で行った。Nested PCRは、1st PCR産物の1/50量をテンプレートにして $94^\circ\text{C}/5\text{分}$ 、 $[94^\circ\text{C}/30\text{秒}$ 、 $66^\circ\text{C}/30\text{秒}$ 、 $72^\circ\text{C}/1\text{分}]$ x 35サイクル、 $72^\circ\text{C}/5\text{分}$ で行った。

(5) hPIV2 Δ HN-EGFPウイルスタイター測定

Vero/HN 各株を24 穴プレート (コーニング社製) に 1.5×10^5 /well で継代し、24 時間後にrPIV2 Δ HN-EGFP を感染多重度 (moi) 0.1 で感染させる。感染3時間後、ウイルス液を除いてOptiPRO SFM で洗浄した後、G418 含有 OptiPRO SFM を加えて培養を開始する。感染4日後に培養上清を全て回収し、新しいG418 含有 OptiPRO SFM を加える。同様の操作を感染後7、11 日後にも行う。14 日目に細胞及び培養上清を回収し、0-4、4-7、7-11 及び11-14 日の間に培養上清中に産生された感染性ウイルス量をTCID₅₀ 法で測定した。

(6) 間接蛍光抗体法

Vero/HN 各株を8 穴チャンバープレート (ibidi 社製) に 2.0×10^5 /well で継代し、24 ~48時間培養する。細胞がコンフルエントにな

ったのを確認して1度PBSで洗浄する。4%パラホルムアルデヒド/PBSを加えて室温で20分間固定した後、PBSで3回洗浄する。0.25% TritonX-100を加えて室温で10分間、膜透過した後、PBSで3回洗浄する。(細胞表面を染色する場合はこの処理は不要) マウス抗HN抗体(M1-1A、三重大より分与)を加えて室温で1時間反応させた後、PBSで3回洗浄する。Alexa Fluor標識したヤギ抗マウスIgG抗体(abcam社製)をPBSで400倍希釈した溶液を加えて室温で1時間反応させた後、PBSで3回洗浄し、80% glycerol/PBSで封入して蛍光顕微鏡で観察した。

(7) 倫理面への配慮

遺伝子組換え体の第二種使用における拡散防止措置については、日本BCG研究所の機関承認済みである。

C. 研究結果

(1) HN 遺伝子導入 Vero 細胞のクローニングと PCR による一次スクリーニング

HN抗原発現ベクターpCXneo-HNの導入遺伝子の発現を確認するため、Vero 細胞にトランスフェクションし、G418 selectionによるクローニングを行った。次いで前年度に確立したNested PCR 法により、全長のHN遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子の両方が検出できるクローンをスクリーニングした(図1)。95個中61個(64%)のPCR陽性クローンが得られた。昨年度に行った1回目のスクリーニングでは、13/55(24%)であったので、効率が格段に改善された。

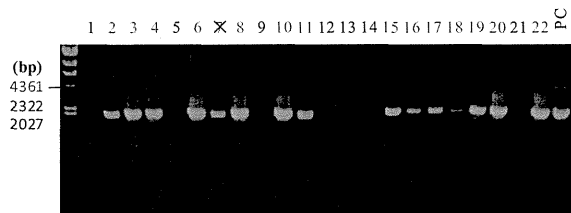


図1 Nested PCRによるHN遺伝子の検出例

(2) rPIV2 Δ HN-EGFP感染を利用した二次スクリーニング

PCRにてHN遺伝子導入が確認されたVero/HN

候補株61株の凍結細胞を融解し、培養を行ったところ、2株の増殖が悪かったため、残り59株の培養を行い、rPIV2 Δ HN-EGFPを感染させた。その結果、59株中25株で感染後のGFPの増加が認められ(図2)、培養上清中への感染性ウイルスの産生が確認された(data not shown)。しかしながら、株間で周囲の細胞へのGFPの広がりには差があり、また上清中への感染性ウイルス産生量にもばらつきがあったため、株によってrPIV2 Δ HN-EGFPの産生量が異なることが示唆された。

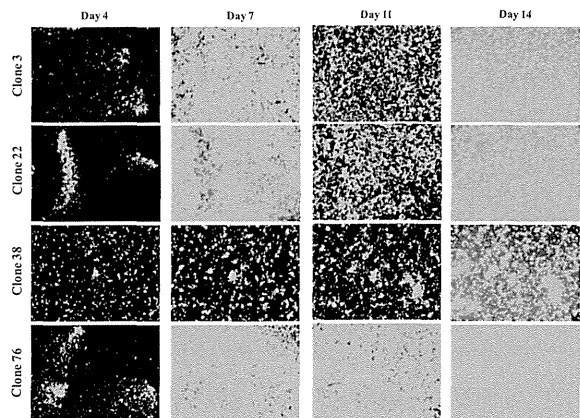


図2 EGFP発現を指標にしたHN発現Vero細胞クローンの選択

(3) Vero/HN 株のウイルス産生能の評価

rPIV2 Δ HN-EGFPの産生が確認された25株を用いてウイルス産生量の比較を行った。即ち、Vero/HNにrPIV2 Δ HN-EGFPをmoi=0.1で感染させ、各培養期間の培養上清を回収して各々の培養期間中のウイルス産生量を測定した。その結果、株によって感染性ウイルスの産生量に差があることが確認され、クローン3、4、10、22、77、91及び76が非常に効率良く感染性ウイルスを培養上清中に産生していることがわかった(図3)。

上記7株に、生育が遅くスクリーニングが遅れたクローン73を加えた8株を用いて、培養上清中のrPIV2 Δ HN-EGFPウイルス量の経時変化を調べた結果、4、22、76、77、91の5クローンで、培養7日以内に 10^7 TCID₅₀/mL以上という、実用化可能なレベルのタイターに達していることがわかった(図4)。